

Lactobacillus acidophilusグループ乳酸菌のヒト腸管付着機構に関する研究

著者	松村 敦
号	683
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/16353

氏 名(本籍)	まつ 松	むら 村	あつし 敦
学 位 の 種 類	博	士	(農 学)
学 位 記 番 号	農	博	第 6 8 3 号
学位授与年月日	平	成	13 年 9 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	<i>Lactobacillus acidophilus</i> グループ乳酸菌の ヒト腸管付着機構に関する研究		
論文審査委員	(主 査) 教 授 齋 藤 忠 夫 教 授 勝 亦 暲 一 教 授 村 本 光 二		

論文内容要旨

緒論

発酵乳は古くから健康食品として、世界中で大量に製造および消費されている。しかし、一般的に発酵乳に用いられる菌種は胃酸・胆汁酸耐性が低く、ヒト腸管では生育しにくい。我が国では、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*(*L.*) *casei* および *L. acidophilus* などを加えることにより、摂取後の腸内増殖により発現する様々な生理効果（プロバイオティクス）を期待した製品も製造されている。中でも *L. acidophilus* は、ヒト腸管内で検出される乳酸桿菌の主要菌種であることが注目され、発酵乳への利用が広がりつつある(Table 1)。プロバイオティック菌を用いた発酵乳の開発設計には、ヒト腸管定住性菌株の選抜とそのメカニズムの解明が重要な課題となる。とくに、運動性を持たない *L. acidophilus* の腸管内での生残性と増殖性にとって、腸管への付着機構はまず初めに検討すべき点である。しかしながら、乳酸桿菌のヒト腸管付着機構は未だ解明されておらず、様々な付着機構が提案されているに過ぎない。

ヒト腸管壁の微絨毛は厚い粘液層に覆われており、*L. acidophilus* が腸管に到達した際、まずこの粘液層に接触して付着する事が予想される(Fig. 1)。この粘液物質は「腸ムチン」と呼ばれており、O-グリコシド型（ムチン型）糖鎖を結合する高分子量糖タンパク質である(Fig. 2)。本研究室では、この腸ムチン糖鎖に注目し、*L. acidophilus* の糖鎖付着性についてこれまで検討を行ってきた。Takahashi らは、入手困難なヒト腸ムチンの代替品として、類似した糖鎖構造を持ち、比較的入手が容易なラット大腸ムチン（RCM）に注目し、RCM コーティングビーズを利用した新規ヒト腸管付着性判別法を開発した(Fig. 3)。本法によりヒト腸管付着性菌の選抜は可能となったが、その操作は非常に複雑であり、多検体選抜が困難であると共に、非特異的吸着の強い B グループ菌株の選抜が難しいなどの問題点が残されていた。そこで本研究では、上記法を改良した新規判別法を開発すると共に、*L. acidophilus* グループ乳酸菌のヒト腸管付着機構の一端を解明することを目的とした。

第一章 ラット大腸ムチンを用いた *L. acidophilus* グループ乳酸菌の

ヒト腸管付着性の新規判別法の開発とその応用

第一節 ラット大腸ムチンを用いた *L. acidophilus* グループ乳酸菌の

ヒト腸管付着性判別方法の開発

多検体同時分析を可能とする、より簡便なスクリーニング法の開発を目的として、有用乳酸菌検索の商業利用も視野に入れた *L. acidophilus* グループ乳酸菌の新規ヒト腸管付着性測定法の開発を行った。

入手困難なヒト腸管ムチンの代用としてラット大腸ムチン(RCM)を 96 穴-マイクロプレートウェルに固定化し、菌体表層タンパク質(SLP)との結合性を調べる方法を開発した(Fig. 4)。96 穴-マイクロプレートを採用することで多検体同時分析だけではなく、付着活性の数値化し相互比較することが可能となった。また、生菌体ではなく SLP を用い、さらに新規緩衝液を用いることにより非特異的吸着を低く押さえることに成功し、B グループ菌も含めた *L. acidophilus* グループ乳酸菌全体の新規ヒト腸管付着活性測定が初めて可能となった。本法を用いて、*L. acidophilus* グループ乳酸菌 35 菌株についての付着性を検討した結果、全菌株において付着性が確認され、個々の菌株において特有の付着活性を示していた(strain-specificity, Fig. 5)。各サブグループで比較した場合、B₁ サブグループにおいて特に強い付着性を示した。ヒト大腸カルノア固定切片を用いた付着性試験においても、上記判別法により選ばれた 5 菌株で強い付着活性が確認された(Fig. 6)。以上の検討により、B グループ菌は RCM に対して強い付着性を示すことから、その菌体表層にはヒト腸管に対しても付着する因子の存在することが初めて明らかとなった。動物糞便および腸管より検出される *L. acidophilus* グループ乳酸菌は、動物種により特徴的なサブグループの存在することが報告されており、ヒトの場合は *L. gasseri*(B₁)が高頻度に検出されている。今回の実験結果は、この報告を支持するとともに、本法がヒト腸管付着性 *L. acidophilus* グループ乳酸菌の判別法として有効であることを示していた。

第二節 新規ヒト腸管付着性判別法を応用した

L. acidophilus グループ乳酸菌付着部位の特定

ラット大腸ムチン(RCM)が高分子量糖タンパク質であることから、菌体はRCMの糖鎖部

位もしくはタンパク質部位を認識し、付着すると考えられる。この付着部位の特定を目指して、以下の検討を行った。

過ヨウ素酸による RCM 糖鎖部分の酸化が及ぼす付着性変化を検討したところ、付着性は 40→20%まで大きく減少した(Fig. 7)。従って、菌体はムチンの糖鎖部位を主として認識し、付着性(レクチン様活性)を示すことが明らかとなった。

認識糖鎖に関する知見を得るために、RCM 糖鎖を構成する 5 種類の単糖および切り出し RCM 糖鎖によるハプテン糖試験を行った。その結果、RCM 糖鎖では付着性の減少が見られたが、単糖では全く認められなかった(Fig. 8, 9)。このことは、菌体が RCM の単糖単位を認識するのではなく、より大きな「オリゴ糖単位」を認識・結合する事を示唆していた。また、各種エキソグリコシダーゼによる RCM 糖鎖の酵素的消化実験においても、*L. gasseri* の 4 菌株は RCM 糖鎖の GalNAc を含むオリゴ糖を認識し、さらに内部配列の GlcNAc や Gal 単位に対する認識性を示す菌株も存在する事を明らかにした。

第二章 選抜されたヒト腸管高付着性菌からのレクチン様タンパク質の精製とその特性解析

第一節 ヒト腸管高付着性菌からの糖鎖付着性タンパク質の精製およびその特性

L. acidophilus のヒト腸管付着性は、菌体表層に存在するレクチン様タンパク質が腸ムチン糖鎖のオリゴ糖単位を認識することにより開始されるものと考えられる。そこで、RCM を固定化した PVDF 膜を「疑似ヒト腸管粘膜」と考え、これに菌体表層タンパク質(SLP)を反応させることにより、RCM 付着性 SLP を単離した(Fig. 10)。

前章の選抜法で高い付着性を示した 7 菌株を対象として、それぞれ RCM 付着性 SLP を回収し、SDS-PAGE 分析に供した(Fig. 11)。全ての菌株で数本の明瞭なバンドが検出された。対照的に、RCM 糖鎖を過ヨウ素酸を用いて分解処理した場合、回収量は微量であり、SDS-PAGE 分析でもバンドは検出されなかった。従って、これらの単離されたタンパク質は糖鎖付着性を持つ RCM 付着性成分(レクチン様タンパク質)であることが確認された。

L. gasseri LA2 は、当研究室においてヒト糞便から分離され、本選抜法において高い RCM 付着性を示した。LA2 由来の RCM 付着性 SLP は、SDS-PAGE 分析にお

いて三本の明瞭なバンドを与えた。これらのタンパク質の分子量は、20、30 および 60kDa と推定され、PAS 染色されないことから、糖鎖を結合しない単純タンパク質であることが明らかとなった。SDS-PAGE ゲルからそれぞれのタンパク質成分を切り出し調製し、アミノ酸組成分析を行った結果、全成分が疎水性アミノ酸に富むことが判った (Table 2)。また、それぞれの成分の N-末端アミノ酸配列を明らかにした (Fig. 12)。

第二節 *L. gasseri* LA2 由来のヒト腸管付着性因子「LA2-20」の 遺伝子構造解析

前節において明らかとなった RCM 付着性 SLP の N-末端配列情報より、オリゴヌクレオチドプローブを作成し、*L. gasseri* LA2 の染色体 DNA よりクローニングを試みた。

30 および 60kDa 成分については、染色体 DNA 上に重複配列が多数存在することから、塩基配列決定には至らなかった。20kDa 成分のクローニングでは、一つの Open Reading Frame(ORF)が確認され、SD 配列の存在および N-末端配列の相同性より、20kDa 成分の構造遺伝子であることが明らかとなった (Fig. 13)。本タンパク質は、176 アミノ酸残基からなり、分子量は 19,393 と計算され、SDS-PAGE で得られた結果を支持するものであった。また、推定される等電点は、9.55 と塩基性であった。ホモロジー検索を行ったところ、*Bacillus stearothermophilus* 由来の ribosomal protein L6 と 61.7%の相同性を示した。これは、リボソームタンパク質の一種であり、タンパク質合成に関与するタンパク質であることは判っているが、その機能性については現在研究が進められている段階である。その特徴として、等電点が塩基性であり (約 10)、DNA および RNA 等の糖鎖を含む高分子成分に対する付着性を持つことが挙げられる。従って、LA2 の菌体表層に存在する本成分も、腸ムチンに結合する糖鎖への特異的付着性に寄与していることが示唆された。

第三章 ビオチニル化プローブを用いた *L. acidophilus* グループ乳酸菌の ヒト腸管付着性の新規判別法へのアプローチ

ラット大腸ムチン (RCM) は大量調製が難しく、その糖鎖構造は複雑でエピトープ部位の判定は難しい。そこで、光学的顕微鏡下のレクチン検索などに使用されるビオチニル化糖鎖プローブ (BP プローブ) を用いた、より簡便な付着性判別法の開発を試みた。

BP プローブの化学構造は、ビオチン部、スペーサー部および糖鎖部より構成されており、非特異的吸着が少ないためにレクチン検索に適している (Fig. 14)。ヒト大腸ムチン結合糖鎖の部分構造を含む 5 種の BP プローブを選択し、*L. acidophilus* の付着性を検討したところ、菌株により糖鎖認識性に大きな違いが見られた (Fig. 15)。総合的な付着性を検討したところ、マイクロプレートを用いた付着性判別法とは大きく異なる結果が得られた (Fig. 16)。この原因として、プローブ糖鎖の種類が限定されており、また硫酸基の存在しない点が考えられる。以上の検討により、本法は *L. acidophilus* の糖鎖認識性の確認には有効な手段であるが、判別法としてはさらに改良の余地が残されているものと考えられた。

総括

数多くの腸管系乳酸菌の中から、人の健康にプラス効果を与えるプロバイオティック乳酸菌としての有用菌株を検索するための選抜システム論の構築は、「プロバイオティクス発酵乳」という機能性食品の新規開発設計に必要不可欠である。とくに、運動性を持たない *L. acidophilus* が腸管内で生残・増殖するには、腸管への付着性は最も重要視されるべき要因である。本研究では、商業利用も視野に入れた、多検体同時分析が可能で、しかも簡便な *L. acidophilus* グループ乳酸菌の新規ヒト腸管付着性判別法を開発すると共に、その付着機構の一端を明らかにすることを目的とした。

RCM とマイクロプレートを組み合わせて利用することにより、新規ヒト腸管付着性判別法の開発に成功した。本法を用いて、乳酸菌 35 菌株の付着性を検討したところ、*L. gasseri* 5 菌株において高い付着性が認められた。選抜された 5 菌株が、ヒト大腸カルノア固定切片を用いた付着性試験においても高値を示したことより、本選抜法はヒト腸管付着性乳酸菌の選抜法として有効であることが示唆された。

上記選抜法を応用し、RCM 内の付着部位の特定を行った。RCM の過ヨウ素酸酸化に

より SLP の付着性が激減したことから、菌体は腸ムチンの糖鎖部位を認識・付着することを明らかにした。さらに RCM 構成単糖および RCM 糖鎖によるハプテン糖試験により、菌体は単糖単位ではなく、より大きな「オリゴ糖単位」を認識・結合していることが示唆された。エキソグリコシダーゼによる RCM 糖鎖の部分分解消化により、付着機構の一部を解明することが出来た。

RCM を固定化した PVDF 膜を用いて、RCM 付着性 SLP を調製した。ヒト腸管付着性の高い 7 菌株について RCM 付着性 SLP を回収し、SDS-PAGE 分析に供したところ、全ての菌株で数本の明瞭なバンドが検出された。当研究室保有株 *L. gasseri* LA2 では、SDS-PAGE 分析において 20, 30 および 60kDa の三本の明瞭なバンドが得られた。それぞれのタンパク質について N-末端解析を行い、得られた配列情報を基にクローニングを行った結果、20kDa のタンパク質成分は 176 アミノ酸残基からなり、分子量 19,393、等電点が 9.55 である塩基性タンパク質と推定された。ホモロジー検索したところ、*Bacillus stearothermophilus* 由来 ribosomal protein L6 と 61.7% の相同性が示された。また、残る 30 および 60kDa 成分は、塩基配列決定には至らなかった。

さらに、市販の BP プローブを用いたより簡便な付着性判別法を考案した。本法を用いて乳酸菌 35 菌株の付着性を検討したところ、糖鎖認識性は菌株特異的であることが確認された。総合的付着性では、前述の RCM 法とは全く異なる結果が得られた。本法は *L. acidophilus* の糖鎖認識性の確認には有効な手段であるが、選抜法として用いるには改善の余地があると考えられた。

現在、厚生省が認可する「特定保健用食品」の効果は一過性であるものが多く、継続的に摂取しなければその恩恵にあずかることは出来ない。今後、乳酸菌の腸管付着性についての研究が進展するならば、長期に渡って有効効果を発揮できる機能性食品の創製が期待できよう。

原著論文

- 1) New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria.
A. Matsumura, T. Saito, M. Arakuni, H. Kitazawa, Y. Kawai, and T. Itoh.
J. Dairy Sci., **82**, 2525-2529 (1999)
- 2) A new screening method for probiotic lactic acid bacteria on the *Lactobacillus acidophilus* group by using carbohydrate probes.
T. Saito, A. Matsumura, H. Kitazawa, Y. Kawai, T. Itoh, and H. Hashiba.
Anim. Sci. J., **71**, 103-108 (2000)
- 3) Cloning of a lectin-like protein isolated from *Lactobacillus gasseri* LA2 that has high adhesion with human intestinal mucosa
A. Matsumura, T. Saito, M. Arakuni, H. Kitazawa, Y. Kawai, and T. Itoh.
J. Dairy Sci. 投稿中 (2001)

参考論文

- 1) 総説
プロバイオティック乳酸菌の腸内定住メカニズム解明へのアプローチ
ー アシドフィルス菌を中心としてー
松村 敦, 齋藤 忠夫, 伊藤 敏敏
日本乳酸菌学会誌, **2**, 133-139(2000)

Table 1 *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria

	Subgroup name	Source
A ₁	<i>L. acidophilus</i>	Rat, Pig, Human, Chicken
A ₂	<i>L. crispatus</i>	Chicken, Human
A ₃	<i>L. amylovorus</i>	Pig, Calf, Human
A ₄	<i>L. gallinarum</i>	Chicken
B ₁	<i>L. gasseri</i>	Human, Chicken
B ₂	<i>L. johnsonii</i>	Pig, Human, Chicken

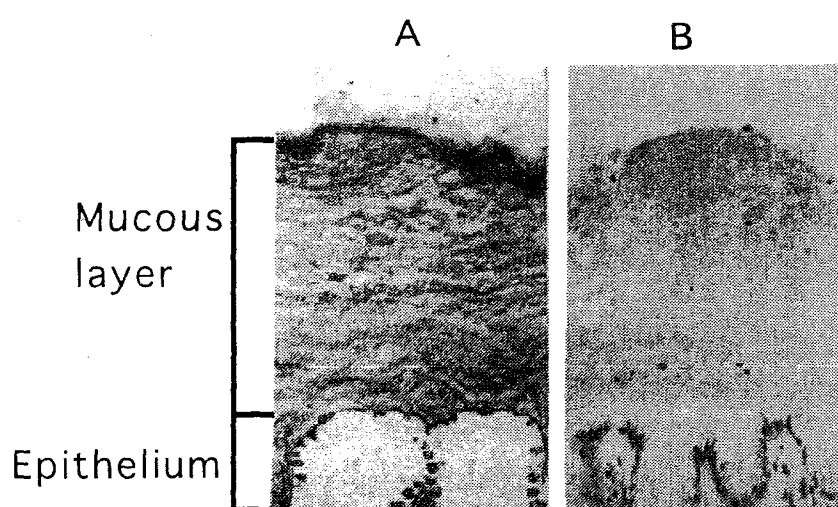


Fig. 1 Histochemical staining of the Carnoy's-fixed mucous layer of Human normal colon

A: Developed by HID-AB double staining

B: Control

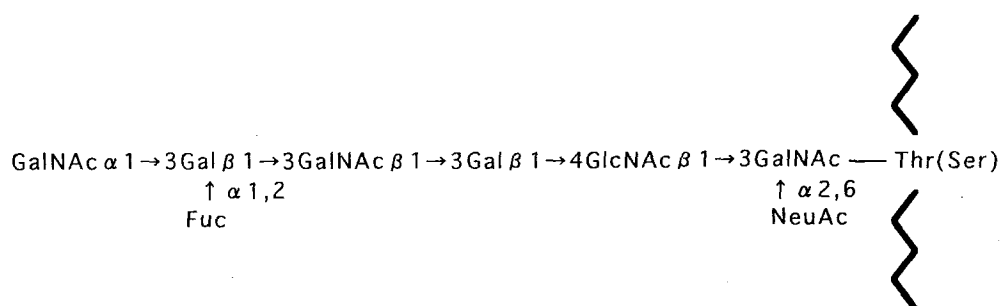


Fig. 2 The most representative sugar chain of human and Rat colonic Mucin

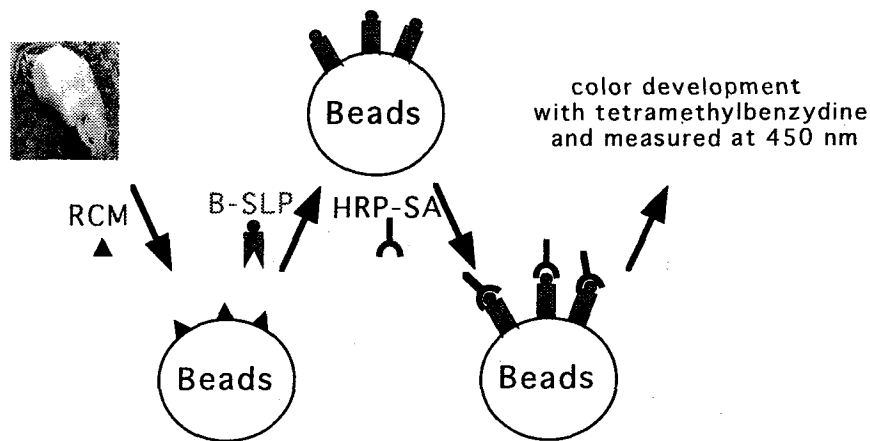


Fig.3 Beads method for screening lactic acid bacteria with high adhesion activity against human intestine

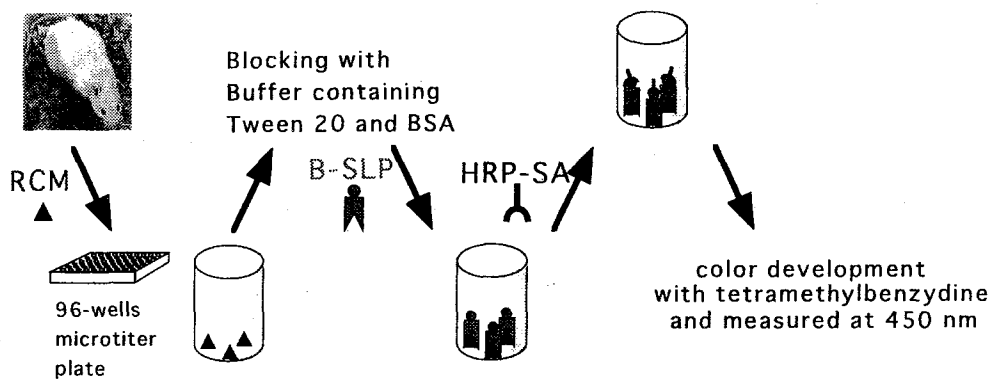


Fig. 4 Microtiter plate method for screening lactic acid bacteria with high adhesion activity against human intestine

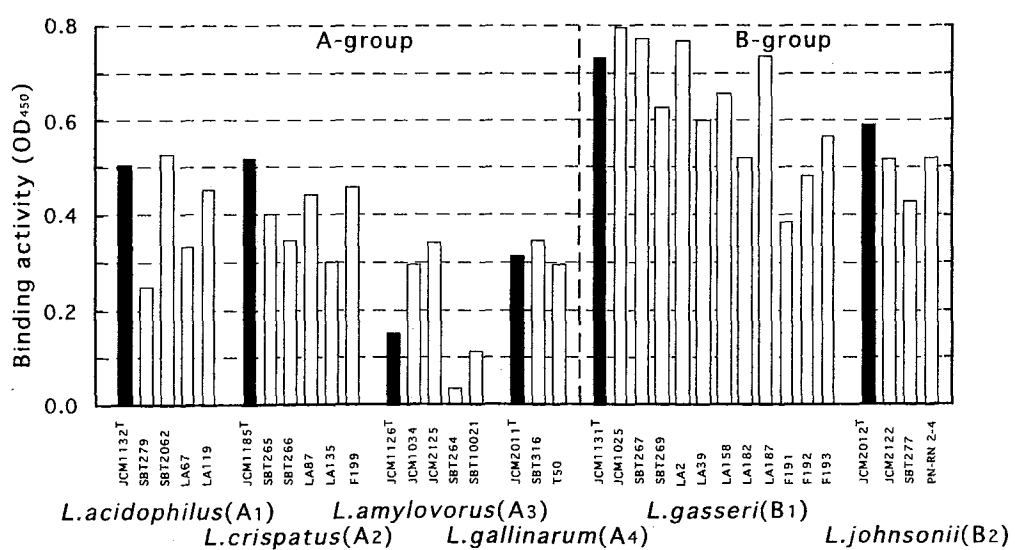


Fig. 5 Comparative binding activity of surface-layer proteins from *L. acidophilus* strains to Rat colonic Mucosa

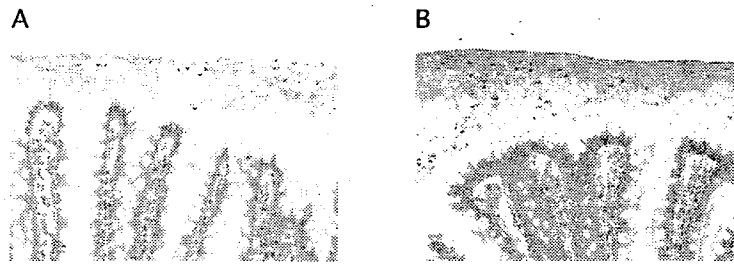


Fig.6 Histochemical staining of the Carnoy's-fixed mucous layer of Human normal colon

A: Stained by biotin-labeled SLP from *L. amylovorus* JCM1034

B: Stained by biotin-labeled SLP from *L. gasseri* LA2

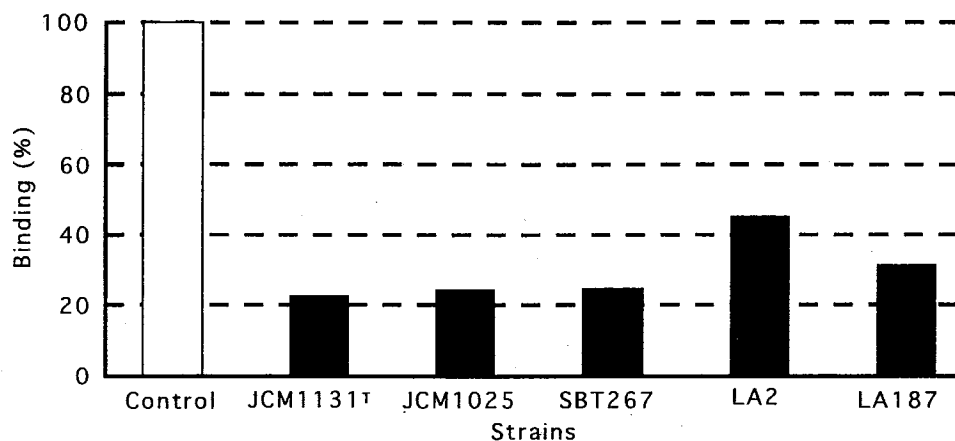


Fig.7 The effect of periodate oxidation of Rat colonic Mucosa, on a microtiter plate, on the binding assay.

White and black bars represent the activity obtained before and after the periodate oxidation treatment, respectively.

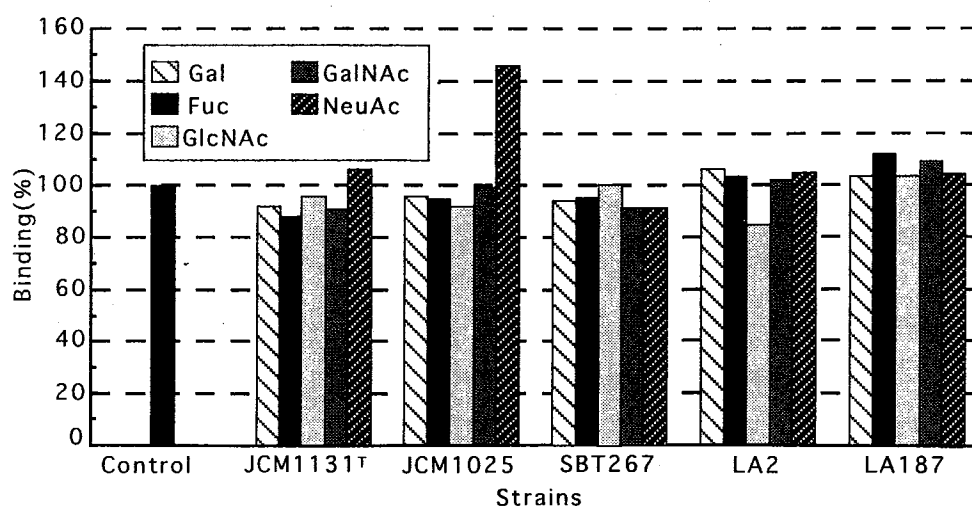


Fig. 8 The change of binding activity of surface-layer proteins from *L. acidophilus* strains to Rat colonic Mucosa after treatment with monosaccharides

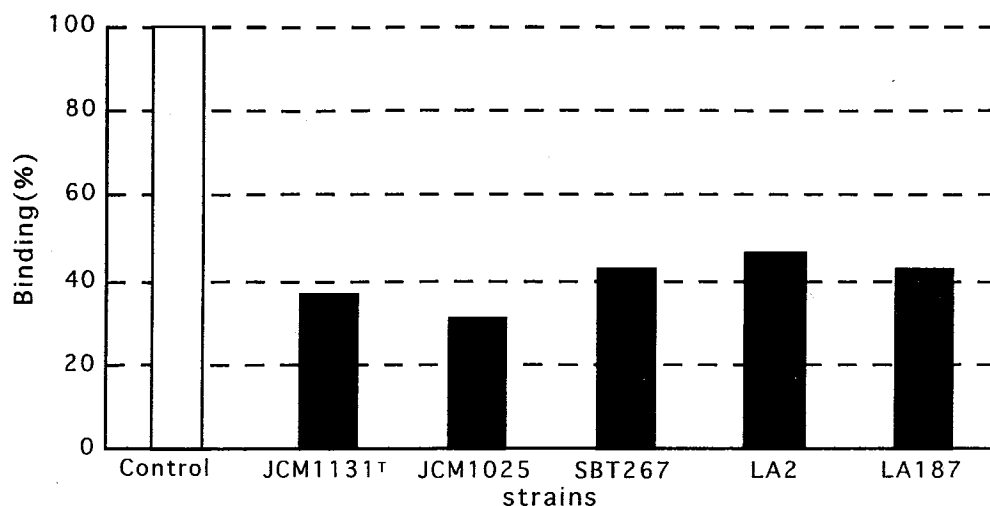


Fig.9 The change of binding activity of surface-layer proteins from *L. acidophilus* strains to Rat colonic Mucosa after treatment with saccharides isolated from RCM

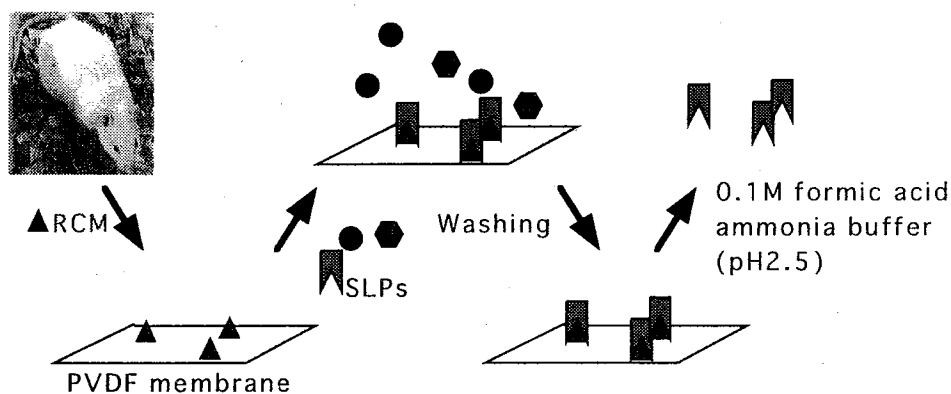


Fig. 10 Preparation of RCM-binding protein by the membrane method

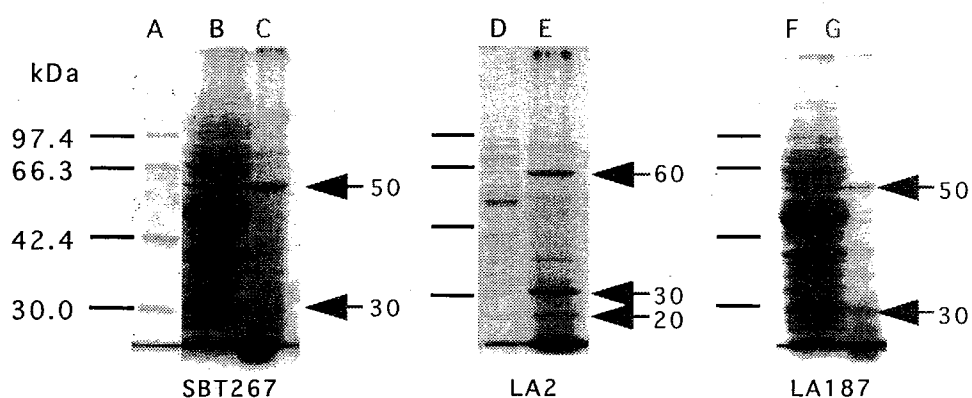


Fig. 11 SDS-PAGE of RCM-binding protein isolated from 3 strains of *L. gasseri*

Lane A : marker proteins

Lanes B, D, F : whole surface layer proteins(SLP) from each strain

Lanes C, E, G : RCM-binding protein isolated from the SLP of each strain

Table 2 Amino acid composition of RCM-bindingprotein from *L. gasseri* LA2

Amino acids	LA2-20	LA2-30	LA2-60 (mol%)
Asx	6.82	4.49	5.88
Glx	11.36	12.39	10.25
Ser	5.68	17.80	14.33
Gly	N.D.	N.D.	N.D.
His	2.27	5.56	2.87
Arg	7.95	5.09	5.69
Thr	9.09	5.29	4.69
Ala	N.D.	N.D.	15.55
Pro	6.82	5.97	3.64
Tyr	5.68	4.10	1.98
Val	13.64	5.53	3.08
Met	2.27	2.39	2.08
Cys	0.00	0.92	0.89
Ile	7.95	3.47	3.12
Leu	4.55	6.01	4.70
Phe	2.27	3.66	5.08
Trp	0.00	8.02	6.34
Lys	13.64	9.31	9.82
Hydrophobic-	37.50	35.05	43.60
Hydrophilic-	29.55	24.05	20.37

N.D.: Not Detected

LA2-20kDa Ser-Arg-Ile-Gly-Leu⁵-Lys-Val-Ile-Glu-Val¹⁰-
Pro-Glu-Lys-Val-Thr-Val-Thr-Lys-Asn-Gly-
Asp-Asp-Ile-Thr- . . .

LA2-30kDa Ala-Lys-His-Ala-Ala-Lys-Lys-Val-Asp-Thr-
Asp
Ala-Lys-Phe-Tyr-Leu-Val-Asp-Glu-Ala-Met-
Asn Ile Lys
Met-Lys-Ala-Lys-Asp-Asn- . . .
Leu Thr

LA2-60kDa Ser-Val-Lys-Glu-Glu-Lys-Thr-Gly-Lys-Thr-
Ser-Gly-Glu-Leu-Thr- . . .
Asp
Ser

Fig. 12 N-terminal amino acid sequences of RCM-binding proteins from *L. gasseri* LA2

10 20 30 40 50 60 70 80
 GTGTGATCACTGATAAAGAAGCTAGAGAAAAAGAACGTCGGCGCGGAAGTTATTGCTTACGTTTGGTAATTTTGACAGAA
 90 100 110 120 130 140 150 160
 AGGAAACTATTAATGAGCCGAATTGGTTTAAAGGTCATCGAGGTTCTGAAAAGGTCACAGTTACCAAAAATGGTGACG
 M S R I G L K V I E V P E K V T V T K N G D D
 170 180 190 200 210 220 230 240
 ACATCACTGTTAAGGGACCAAAAGGTGAACCTTACTAGATACTTTGATCCACGCATTACCTTTGAACAAAAAGATGGAGAA
 I T V K G P K G E L T R Y F D P R I T F E Q K D G E
 250 260 270 280 290 300 310 320
 ATTCATTTTGTGCTTCAAATGAAGCTGATAAAGCTCTTCATGGTACTGAAAGAGCAAATCTTGCTTCCATGATTGAAGG
 I H F S R S N E A D K A L H G T E R A N L A S M I E G
 330 340 350 360 370 380 390 400
 TGTAAGTATGATGATATGTTAAGAAGTTAACTTTAGTTGGTGGTGGATACCGTGCAGTTGCACAAGGTAAGAAATTAACCT
 V T D G Y V K K L T L V G V G Y R A V A Q G K K L T L
 410 420 430 440 450 460 470 480
 TAAATGTTGGTTACTCTACCCAGTTGTATTTGAAGCACCAGAAGGTGTTACAGTTAAACTCCATCAGCAACTTCAATT
 N V G Y S H P V V F E A P E G V T V K T P S A T S I
 490 500 510 520 530 540 550 560
 GAAATTGAAGGTATTTCAAAACAAGTTGTAGGTCAATTTGCGGCAGAAATTCGTGATGTTTCGTCCACCAGAACCTTACAA
 E I E G I S K Q V V G Q F A A E I R D V R P P E P Y K
 570 580 590 600 610 620 630 640
 GGGTAAAGGTATTCGTTACGAAGACGAATATGTACGTCGCAAGGAAGGTAAGACTGGTAAATAATAAATAGAAAATTTT
 G K G I R Y E D E Y V R R K E G K T G K * *
 650 660 670 680 690 700 710 720
 GAGGTGAAATTGTGATTCTAAACCAGATAAAAAACAATTACGCTTAAAGCGTCATAAACGTATTCGTGGAAGATTCT
 730 740 750 760 770 780 790 800
 GGTACTGCTGAGCGCCACGCTTAAGTGTTCGTTCAAACAAAAACATCTACGCTCAATTAATTGATGATGATAGAGGG
 810 820 830 840 850 860 870 880
 TGTAACGCTTGCAAGTGCCTCAACAAATGATAAAATATTTTCAGCTGAAGGTTCTAAGATGGAACAAGCTGCTGAAGTAG
 890 900
 GTAAAGCTTGCGTAATCA

Fig. 13 Amino acid sequence of 20kDa RCM-binding protein from *L. gasseri* LA2

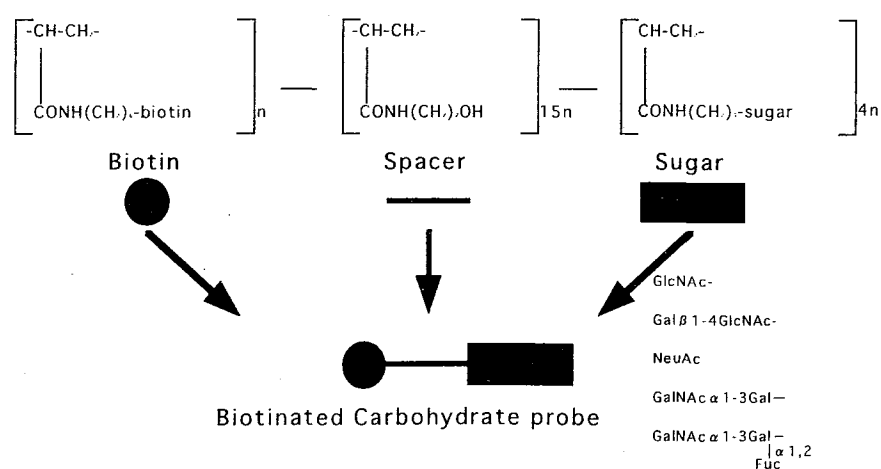


Fig.14 The general structure of commercial carbohydrate probe

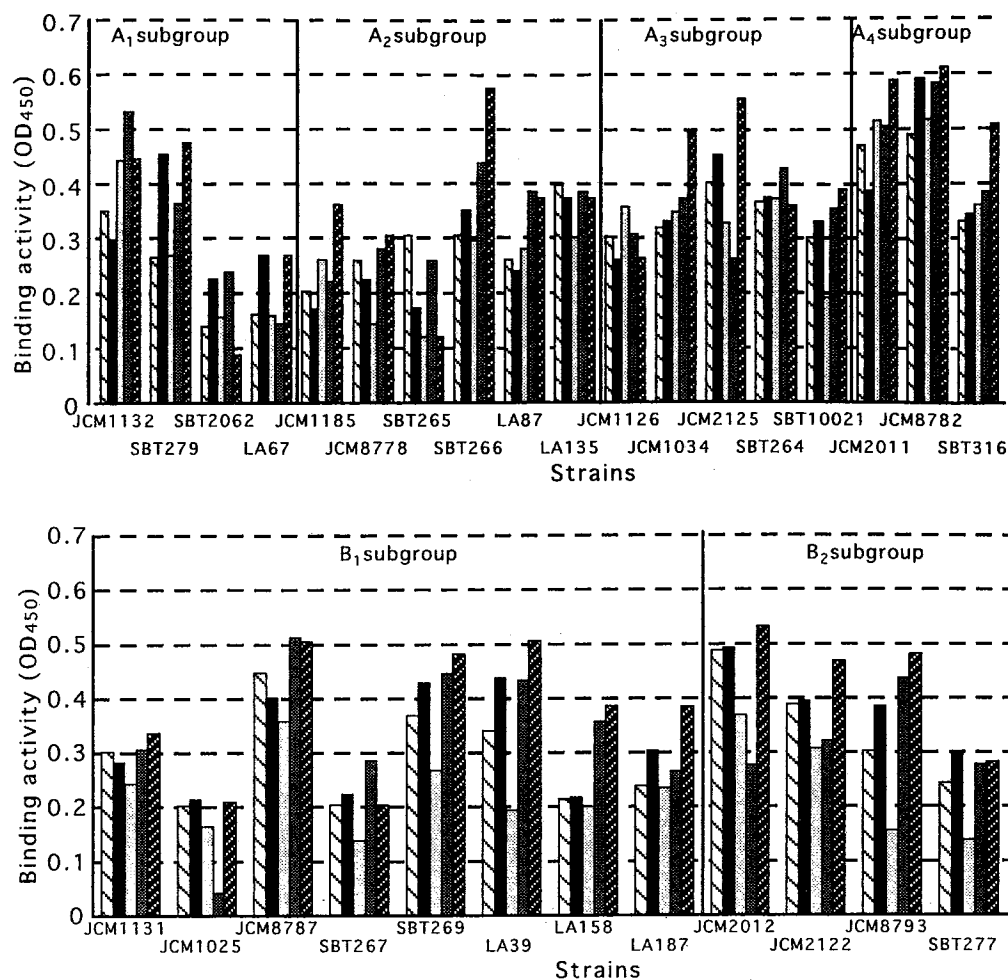


Fig. 15 Reactivity of *L. acidophilus* group lactic acid bacteria with 5 different biotinylated probes

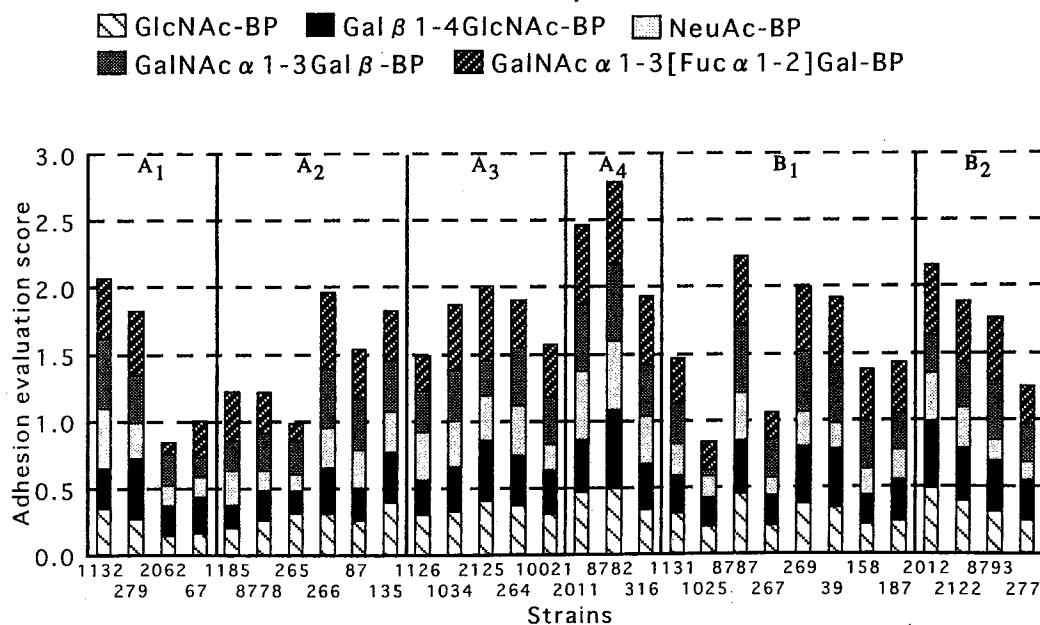


Fig. 16 Adhesion evaluation score of *L. acidophilus* group calculated from biotinylated probe binding assay

論文審査結果要旨

発酵乳（ヨーグルト）は来るべき高齢化社会において、保健効果の面からも推奨される優れた食品の一つである。近年では、酪農乳酸菌に加えて腸管から単離した腸管系乳酸菌が積極的に使用されている。とくに「プロバイオティック乳酸菌」は、保健効果のきわめて優れた腸管系乳酸菌として位置づけられ、その有効利用研究が開始されている。しかしながら、ヒト腸管に付着性を有する有用乳酸菌を迅速かつ的確に選抜するマススクリーニング法はいまだ開発されておらず、その腸管付着性機構は分子レベルで解明されていない。本研究は、ヒト腸管から単離される主要乳酸桿菌であるアシドフィルス菌（*Lactobacillus acidophilus*）に焦点を当て、生化学的、細菌学的、分子生物学的手法を駆使して本菌種の新規有用性を明らかにし、発酵乳製品への応用を目指したものである。

発酵乳（ヨーグルト）の食品形態で摂取した乳酸菌は、プロバイオティック乳酸菌として機能するためには、ヒト腸管壁への菌体の付着性がきわめて重要な形質となる。本研究では、①ヒト大腸ムチンの結合糖鎖と化学構造の酷似するラット大腸ムチン（RGM）を用いて菌体表層レクチンの結合性を評価する「RGM スクリーニング法」による高レクチン活性株の選抜、②ヒト大腸（S 字結腸）組織の腸ムチンを含む粘液層を完全な形で残せる「カルノア固定切片法」によるヒト腸ムチンへの付着性の確認、③レクチンの基質特異性と結合糖鎖部位を推定できる「糖鎖プローブ法」による認識糖鎖のエピトープ部分の決定、という独創的な 3 つの手法を組み合わせることにより、機能性ヨーグルト用のプロバイオティックアシドフィルス菌の「選抜評価システム」を初めて確立した。

さらに、菌体表層レクチンの新規調製法の開発と実際に単離したレクチンのクローニングによる構造決定を試みた。その結果、RGM を疎水性膜表層に固定化した「擬似ヒト腸管粘膜」を作成し、そこに付着するレクチン本体を選択的に調製するという新手法を開発し、*L. gasseri* LA2 の細胞表層レクチン（LA2-25）の単離とクローニングに成功した。本手法を「RGM スクリーニング法」と組み合わせることで、ヒト腸ムチン糖鎖を認識するレクチンおよびその付着機構を分子レベルで特性解析する道が初めて拓かれた。

以上の結果から、本研究ではプロバイオティック乳酸菌の効果的な選抜システムを構築することができ、この原理を用いて単離精製したアシドフィルス菌の菌体表層レクチンの存在と構造を遺伝子工学的手法を用いて明らかにすることができた。本研究は、アシドフィルス菌の腸管定住性に関する基礎的知見を広げたばかりでなく、新しい発酵乳製品の開発に応用可能とした。

そこで、審査員一同は博士（農学）の学位を授与するに十分値するものと最終的に判断した。